

УДК 632.3:632.4

**М. М. Никитин¹, Н. В. Стацюк²,
П. А. Французов¹, В. Г. Джавахия²,
М. В. Приданников², А. Г. Голиков¹**

¹ООО «ГенБит»,
117246, Россия, Москва, пр. Научный, 20, стр. 2,
golikov@genbitgroup.com

²ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский
институт фитопатологии,
143050, Россия, Московская обл., р. п. Большие Вяземы,
ул. Институт, вл. 5,
nataafg@gmail.com

ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЕ qPCR-МАТРИЦЫ: ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ПОДХОД ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ШИРОКОГО СПЕКТРА БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ПОЛЕВЫХ ЛАБОРАТОРИЙ*

Ключевые слова: фитопатогенные микроорганизмы, on-site диагностика, ПЦР в реальном времени, ПЦР-микроматрицы, картофель.

Успешное развитие сельскохозяйственной отрасли экономики требует обеспечения эффективной защиты сельскохозяйственных культур от экономически важных фитопатогенов – вирусов, бактерий, грибов, нематод и т. п. Несмотря на значительный прогресс в современных технологиях защиты растений, ежегодные глобальные потери урожая на корню, связанные с развитием фитопатогенных микроорганизмов, составляют не менее 10–16%; еще 6–12% урожая теряются в процессе хранения [1]. Важным средством минимизации потерь урожая служит своевременное и точное выявление и идентификация возбудителей болезней растений.

Для конечного потребителя диагностических тест-систем критически важными являются следующие факторы: высокая чувствительность и надежность исследования в комбинации с невысокой его стоимостью, возможность осуществления экспресс-анализа на месте (без пересылки материала в стационарные диагностические лаборатории), простота процедуры, а также возможность одновременной детекции спектра патогенов, что дополнительно экономит время и средства потребителя. Существующие в настоящее время лабораторные и полевые методы диагностики болезней картофеля (иммунологические и ПЦР-технологии) не отвечают в полном объеме вышеперечисленным требованиям, а предлагаемые на мировом рынке лабораторные тесты и коммерческие тест-системы, как правило, основаны на принципе «один патоген – один тест».

В рамках выполняемого авторами исследовательского проекта был применен новый подход к диагностике патогенных микроорганизмов, основанный на использовании qPCR микрочипов (микроматриц), обеспечивающих возможность

*Работа осуществляется при поддержке Российского научного фонда (проект № 16-16-04109).

© Никитин М. М., Стацюк Н. В., Французов П. А., Джавахия В. Г., Приданников М. В.,
Голиков А. Г., 2018

одновременного проведения 30–48 (в перспективе – 96) независимых реакций амплификаций на одном микрочипе в стандартных условиях на микрочиповом амплификаторе AriaDNA.

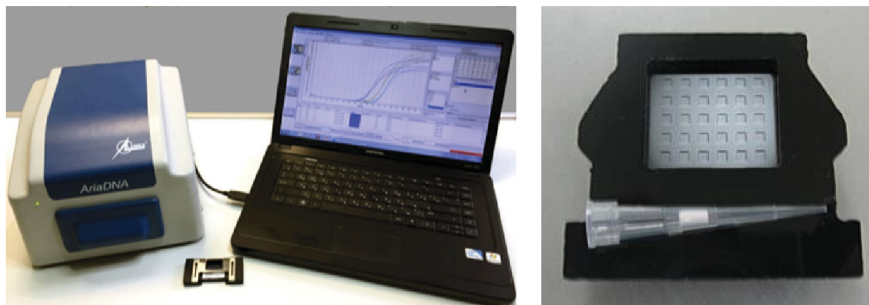


Рис. 1. Слева: микрочиповый амплификатор AriaDNA в процессе работы. Справа: 30-луночный qPCR микрочип

Помимо невысокого расхода реагентов (реакционный объем 1,2 мкл), qPCR-микроматрицы характеризуются высокой производительностью и скоростью анализа (одновременная диагностика до 8–10 патогенов в одном образце в течение 1,5–2 ч с учетом пробоподготовки), а также гибкой конфигурацией, позволяющей формировать набор тест-систем в соответствии с пожеланиями заказчика или под конкретный регион или сельскохозяйственную культуру. Уникальной особенностью тест-систем является возможность длительного хранения матриц-пресервов с иммобилизованными на поверхности и стабилизированными компонентами ПЦР-смеси при комнатной температуре (3–6 месяцев в зависимости от типа матрицы), а также существенное снижение числа и сложности необходимых для проведения анализа манипуляций. Вышеперечисленные особенности, а также портативность микрочипового амплификатора и автоматическая обработка и анализ полученных результатов обеспечивают возможность применения технологии ПЦР-диагностики в матричном формате в условиях полевых лабораторий и не требуют высокой квалификации оператора.

В ходе выполнения проекта были разработаны высокочувствительные (в основном 1–10 копий ДНК/РНК на реакцию) тест-системы для выявления и идентификации 8 вирусных/виroidных, 8 бактериальных, 8 грибных/оомицетных и 4 нематодных патогенов картофеля; планируется также разработка тест-систем для диагностики 4 фитоплазменных инфекций и 3 галловых нематод картофеля. Реализованы и успешно валидированы в лабораторных и полевых условиях микроматрицы для одновременной диагностики 8 вирусных/виroidных (PVYo, PVYntn, PVX, PVA, PVS, PVM, PLRV, PMTV, PSTVd) и 7 бактериальных/оомицетных (*Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Dickeya solani*, *D. dianthicola*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*, *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*) болезней картофеля [2]. Проходят лабораторные и полевые испытания микроматрицы для одновременной диагностики 6 бактериальных патогенов, вызывающих мягкую гниль клубней и черную ножку растений картофеля, а также 6 грибных патогенов картофеля. Проведенный в 2015–2017 гг. широкомасштабный скрининг вирусных/виroidных и бактериальных/оомицетных патогенов кар-

тофеля в 11 регионах России продемонстрировал перспективность использования данной технологии для оценки фитосанитарного состояния посадок картофеля в регионах и географической распространенности целевых патогенов, а также позволил впервые получить данные о наличии и составе смешанных вирусных и бактериальных инфекций в исследованных регионах [3].

Список литературы

1. *Chakraborty S., Newton A. C.* Climate change, plant diseases and food security: an overview // *Plant Pathology*. 2011. Vol. 60. P. 2–14.
2. Matrix approach to the simultaneous detection of multiple potato pathogens by real-time PCR / M. M. Nikitin, N. V. Statsyuk, P. A. Frantsuzov, V. G. Dzhavakhiya, A. G. Golikov // *J. of Applied Microbiology*. 2018. Vol. 124 (3). P. 797–809.
3. Широкомасштабный скрининг РНК- и ДНК-содержащих патогенов картофеля при помощи ПЦР в матричном формате / П. А. Французов, М. М. Никитин, А. М. Малько и др. // *Достижения науки и техники АПК*. 2019. № 3. С. 45–49.

УДК 578.85/.86578.864

Ю. А. Шнейдер, Г. Н. Кушнир

ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений»,
140150, Россия, Быково, ул. Пограничная, 32, yury.shneyder@mail.ru

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ОСОБО ОПАСНЫХ ВИРУСОВ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

Ключевые слова: Plum pox virus, вирус шарки слив, ACLSV, ПЦР, псевдошарка.

В России широко возделывают более 20 родов, а также групп, близких между собой видов плодовых культур, например, яблоня, груша, слива, вишня, черешня и другие. На территории нашей страны произрастают как дикорастущие, так и культурные виды, а также сорта.

Яблоня домашняя составляет основные площади плодовых насаждений как в Российской Федерации, так и во многих других странах умеренного и субтропического климата. Груша обыкновенная занимает по популярности второе место среди плодовых культур и выращивается практически во всех зонах умеренного климата. Вишня обыкновенная встречается только в культуре; в дикой природе не встречается. Некоторые биологи считают вишню обыкновенную естественным гибридом вишни степной и черешни. Слива – род семейства Розоцветные (*Rosaceae*). Включает около 250 видов, распространенных, главным образом, в северных умеренных областях земного шара. Многие представители рода широко известные плодовые культуры. Подрод Слива подразделяется на пять секций, куда входят такие виды, как абрикос